



O POTENCIAL DA MELATONINA COMO SUPRESSORA DE CRISES EPILEPTICAS: O ZEBRAFISH COMO MODELO DE INVESTIGAÇÃO

Palavras-Chave: melatonina, epilepsia, crises epilépticas, zebrafish, drogas antiepilépticas

Autores(as):

Patrícia Guimarães Custódio, FCM – Unicamp

Viviane Cristina Fais, FCM – Unicamp

Allana Lauren Pratti, FCM – Unicamp

Leonardo Costalonga Rodrigues, FCM - Unicamp

Prof(a). Dr(a). Cláudia Vianna Maurer Morelli, FCM – Unicamp

INTRODU O

A epilepsia é uma condi o cerebral cr nica que atinge milhões de pessoas no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública pela Organiza o Mundial da Saúde (OMS). Seus principais sintomas são as crises epilépticas, que podem ser focais ou generalizadas, e se manifestar de diferentes formas, incluindo convulsões, espasmos, rigidez muscular, entre outras. Atualmente existem diversas drogas antiepilépticas (DAEs) que podem ser empregadas no tratamento dessa condi o. No entanto, estima-se que aproximadamente 30% dos pacientes sejam refratários ao tratamento medicamentoso. Essas pessoas apresentam os casos mais graves, pois as epilepsias refratárias podem ser progressivas, aumentando o risco de danos ao sistema nervoso central, além de outras comorbidades e até a morte súbita (1). Assim, novas pesquisas são necessárias na busca de outros compostos terapêuticos que visem suprimir as crises epilépticas e contribuir com o tratamento das epilepsias. Dentro dessa realidade, esse projeto visa investigar o uso da melatonina na supressão das crises epilépticas usando o zebrafish como modelo experimental. Essa proposta foi baseada na capacidade que esse neurohorm nio tem em atuar como agente antiinflamatório, antioxidante e neuroprotetor (2). Além disso a melatonina é capaz de aumentar os níveis de GABA e serotonina no hipotálamo (2), potencializando os receptores GABAérgicos, hiperpolarizando as células e assim, diminuindo a excitabilidade neuronal (3). O *zebrafish*   um modelo eficaz para *screening* de novas drogas, visto apresentarem muitas vantagens como seu tamanho pequeno, baixo custo de manuten o, curto tempo de gera o, fecunda o e desenvolvimento externo, fácil manipula o(4). Além disso, apresentam homologia fisiológica e genética com o ser humano, incluindo o sistema nervoso central (4), e possuem glândula pineal com capacidade de produzir melatonina (5). Ainda, o *zebrafish* foi descrito como um modelo apropriado para o estudo das epilepsias e crises epilépticas (6). Desse modo, nosso objetivo foi avaliar o papel da melatonina na supressão de crises epilépticas evocadas pelo agente convulsivante pentilenotetrazol no cérebro de larvas de zebrafish.

MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de  tica no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp n  5980-1/2022. Foram mantidos de dois a três peixes adultos por litro em aquários de 30 a 50 litros, nos quais a água declorada

permaneceu a uma temperatura de aproximadamente 26 ± 2 °C (7). Os animais adultos foram alimentados três vezes ao dia com ração flocada comercial Tetramin e uma vez ao dia com artêmia e paramécio. A temperatura ambiente do biotério foi controlada em 23 °C, assim como o ciclo de luz (14 horas de período claro e 10 horas de escuro) (8). Os embriões de zebrafish foram obtidos por meio da fecundação natural e mantidos em placas de Petri com água reconstituída, e conservados em incubadora programada com temperatura e fotoperíodo iguais àqueles em que os peixes adultos foram expostos (9).

As larvas do peixe-zebra (com 7dpf) foram divididas aleatoriamente em 4 grupos: (i) Grupo controle, animais mantidos em água a 25°C, sem nenhuma exposição ao PTZ ou à melatonina (n=30); (ii) Grupo PTZ, animais expostos somente ao PTZ 15 mM por 20 minutos (n=30); (iii) Melatonina 6800 + PTZ, animais tratados com 6800 nM de melatonina (10) por 30 minutos antes de serem expostos ao PTZ 15 mM por 20 minutos (n=30); (iv) Melatonina 13600 + PTZ, animais tratados com 13600 nM (10) de melatonina por 30 minutos antes de serem expostos ao PTZ 15 mM por 20 minutos (n=30).

A partir da divisão dos grupos, foram realizados testes comportamentais:

1. **Latência e número de crises (n=12)** – A latência se refere ao período entre o início da exposição da larva ao PTZ e o aparecimento de comportamento semelhante ao estágio 3 de uma crise epiléptica (6) e a contagem do número de crises epilépticas refere-se ao total de vezes em que a larva apresentou esse comportamento. Ambos os parâmetros foram feitos como descritos por Barbalho et al. 2016 e realizados por meio do estudo duplo-cego a partir da filmagem dos animais. As larvas foram colocadas em placa de 96 wells e filmadas por 10 minutos com celular Samsung A50, fixado em plataforma a 15 cm de distância para posterior análise.
2. **Eletroencefalografia/EEG (n=5)** – As larvas com 7 dpf foram imobilizadas em agarose low melting 1,2%. Após indução das crises com PTZ, os registros eletrofisiológicos foram realizados utilizando um eletrodo de aço inoxidável de 125 µM de diâmetro com um isolamento de poliamida de 10 µM, que foi manipulado por meio de um micromanipulador triaxial. O eletrodo foi posicionado no teto óptico da larva. Os sinais elétricos foram pre-amplificados por 10X, utilizando o Intan RHD2000, e filtrados de 1 a 1.000 Hz. Nesse caso, foram coletados 10k de amostras por segundo ao longo dos experimentos, sendo o nível do ruído sempre testado previamente.
3. **Teste molecular (n=5)** – A RT-qPCR real foi realizada para analisar os níveis de transcrição de *c-fos*, gene marcador de atividade neuronal, além da investigação dos transcritos para o gene *sod1*, gene relacionado com a inflamação e o estresse oxidativo. A extração total do RNA foi realizada pelo método do Trizol®, seguindo as instruções do fabricante e a integridade e qualidade do RNA, determinada por meio da eletroforese em gel e quantificação em Epoch™ Ultraviolet Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) respectivamente. O cDNA foi obtido pela transcrição reversa (RT-PCR) usando High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems™, Califórnia, USA), seguindo as instruções do fabricante. A qPCR foi obtida em equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) usando o reagente SYBR® Green Master Mix (Bio-Rad). A quantificação relativa de cada gene foi realizada em triplicata e o gene *ef1a111* foi empregado como normalizador. Para cada amostra (n=1) foi realizado um pool de 5 cabeças para se obter quantidade suficiente de RNA total para a quantificação. A análise da expressão relativa foi calculada de acordo com a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). A análise estatística foi feita por meio do teste de ANOVA com correção de Tukey usando o programa GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados são apresentados como média \pm SEM e a significância será considerada quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Latência e número de crises

O efeito do tratamento com a melatonina antes das convulsões induzidas por PTZ foi analisado observando-se a latência do início das convulsões (estágio 3, equivalente à mioclonias com posterior perda da postura corporal) e o número de comportamentos semelhantes a convulsões. Cada larva foi observada individualmente, por um estudo duplo-cego. Nos animais pré-tratados com melatonina 13.600 nM, encontramos um aumento significativo

da latência de início em comparação com os animais do grupo PTZ e com os animais do grupo tratado com melatonina 6.800 nM ($p \leq 0,0001$; Fig. 1). Já em relação ao número de crises, não foi observada uma diferença estatisticamente relevante entre os grupos ($p > 0,05$; Fig. 2) apesar de haver uma tendência de diminuição das convulsões nos animais tratados com melatonina em relação aos tratados somente com PTZ.

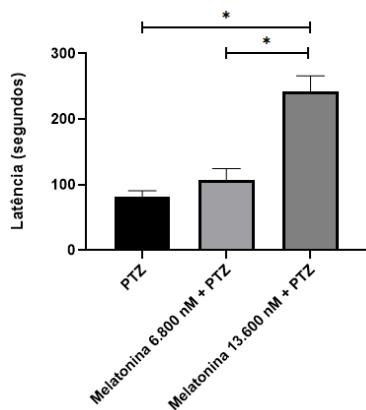


Figura 1

Efeito do tratamento com melatonina antes das convulsões induzidas pelo PTZ na latência das convulsões. O grupo PTZ foi composto por animais expostos ao PTZ 15 mM ($n=12$). Os animais dos demais grupos foram expostos a 6.800 ou 13.600 nM de melatonina por 30 minutos antes das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) ($n=12$ /grupo). A latência do primeiro comportamento semelhante à convulsão (estágio 3, equivalente à perda da postura corporal) foi avaliada após observação visual. Os dados são apresentados como média \pm SEM. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com correção de Tukey. Um asterisco (*): $p \leq 0,0001$.

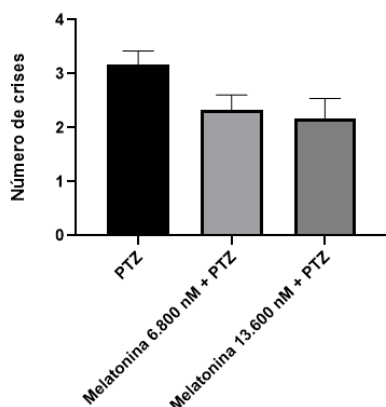


Figura 2

Efeito do tratamento com melatonina antes das convulsões induzidas pelo PTZ no número de comportamentos semelhantes a convulsões. O grupo PTZ foi composto por animais expostos ao PTZ 15 mM ($n=12$). Os animais dos demais grupos foram expostos a 6.800 ou 13.600 nM de melatonina por 30 minutos antes das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) ($n=12$ /grupo). O número de convulsões (estágio 3, equivalente à perda da postura corporal) foi avaliado após observação visual durante 10 minutos de exposição ao PTZ. Os dados são apresentados como média \pm SEM. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com correção de Tukey.

Dados Eletrográficos

A avaliação dos dados eletrográficos durante a indução das crises epiléticas mostrou que os animais que receberam pré-tratamento com melatonina 13.600 nM antes da indução de crises epiléticas, tiveram uma queda na quantidade de eventos ictais ($p \leq 0,01$) e uma redução do tempo de duração do evento ($p \leq 0,01$) (Figura 3). Não houve significância nos mesmos dados para os animais a 6.800 nM de melatonina em relação ao PTZ ($p > 0,05$).

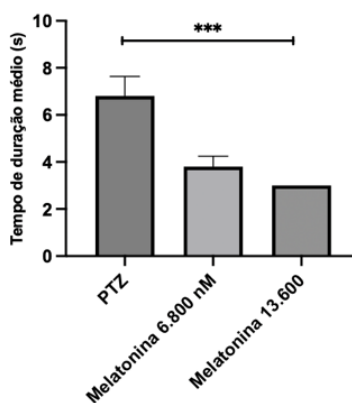
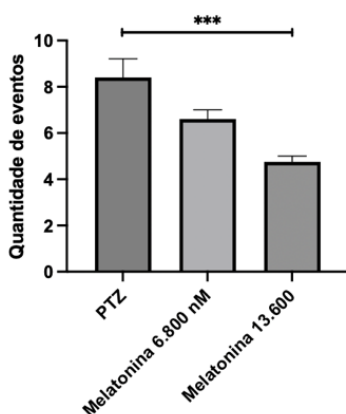


Figura 3

Impacto da exposição à melatonina antes das convulsões induzidas pelo PTZ na quantidade de eventos ictais e no tempo de duração dos eventos, registrados pela encefalografia. O grupo PTZ foi composto por animais expostos ao PTZ 15 mM (n=5). Os grupos de melatonina 6.800 e 13.600 nM foram compostos por animais que receberam tratamento com melatonina antes de serem expostos ao PTZ (n=5/grupo). Os dados são apresentados como média \pm SEM. A análise estatística foi realizada pelo Teste de Kruskal-Wallis. Três asteriscos (**): $p \leq 0,01$.

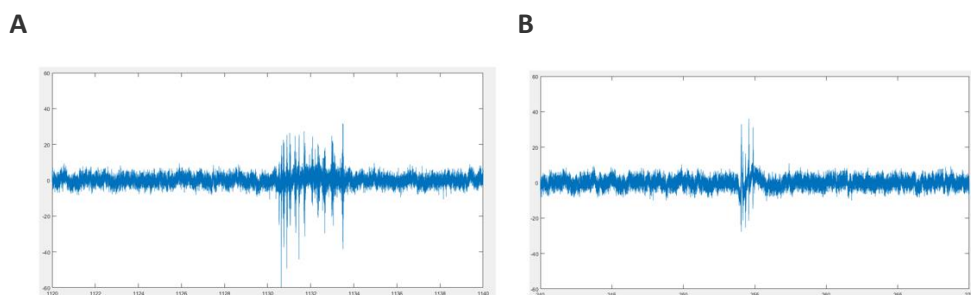


Figura 4. Representação gráfica de um evento ictal no grupo PTZ (A) e no grupo PTZ+melatonina 13600nM (B).

Teste molecular

A quantificação dos níveis de mRNA dos genes *cfos* e *sod1* após as crises induzidas por PTZ revelaram que o tratamento com melatonina antes das convulsões induzidas por PTZ não causam uma expressão significativa de mRNA de *sod1* e *c-fos*. Como mostrado na figura 5A, a expressão de *c-fos* no grupo controle foi estatisticamente diferente para todos os animais ($p \leq 0,05$), no entanto, a melatonina não causou impacto positivo na expressão desse gene ($p > 0,05$). A expressão de *sod1* não demonstrou nenhuma diferença estatística entre os grupos estudados ($p > 0,05$; Fig. 5B).

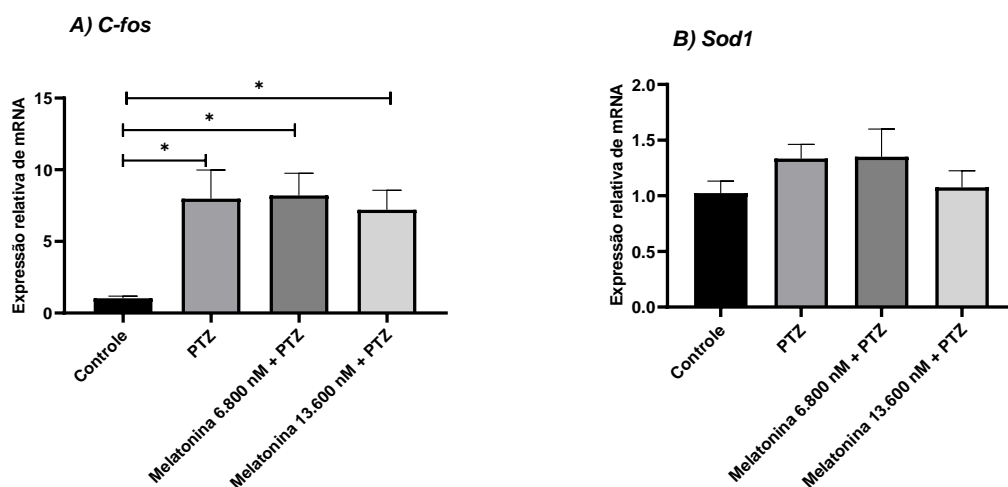


Figura 5

Quantificação relativa dos níveis de transcrição dos genes *c-fos* (A) e *sod1* (B) após convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) no cérebro de peixe-zebra aos 7 dias pós-fertilização. O grupo PTZ foi composto por animais expostos a 15 mM de PTZ por 20 min. Os grupos de melatonina 6.800 e 13.600 nM foram compostos por animais que receberam tratamento com melatonina antes de serem expostos ao PTZ. Os animais do grupo controle foram tratados apenas com água, sem PTZ ou tratamentos com melatonina (n = 5 por grupo). Os dados são apresentados como média \pm SEM. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) com correção de Tukey. Dois asteriscos (**): $p \leq 0,05$.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a melatonina em sua maior concentração testada neste estudo (13.600nM) aumentou a latência para o surgimento da primeira crise epiléptica ($p \leq 0,05$), porém, a redução do número de crises em ambos os tratamentos com melatonina (6.800nM e 13.600nM) não foi significativa ($p > 0,05$), embora haja uma tendência de diminuição. (Figura 2). No entanto, ao compararmos o número de eventos ictais e a duração desses eventos, os dados sugerem que a melatonina na concentração 13.600 foi capaz de atenuar os achados eletrográficos (Figura 3 A e B). Em relação aos testes moleculares, os achados mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos com PTZ e ambas as concentrações de melatonina. Esses dados mostram que há a necessidade de maiores investigações sobre o papel da melatonina nas crises epiléticas, em especial usando-se concentrações maiores e/ou exposição prolongada do embrião/larva a melatonina, assim como avaliarmos outros tempos de coleta para a análise de expressão gênica. A partir dos resultados, a concentração de 13.600 nM de melatonina se mostrou mais promissora que a concentração de 6.800 nM de melatonina nas condições avaliadas neste estudo.

BIBLIOGRAFIA

1. Laxer KD, Trinka E, Hirsch LJ, Cendes F, Langfitt J, Delanty N, et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav* (2014) 37:59–70. doi:10.1016/j.yebeh.2014.05.031
2. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Amado D, Mazzacoratti M da GN. Ciência e cultura. [Internet]. Vol. 56, Ciência e Cultura. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência; 2004 [cited 2021 May 15]. 43–44 p. Available from: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252004000100028&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
3. De Lima E, Cabral FR, Cavalheiro A, Da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Amado D. Neuroprotector effect of melatonin and N-acetylserotonin in the epileptogenesis and in the control of seizures in animals submitted to the pilocarpine model 12(2):75-78. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*. 2006.
4. Simonetti RB. Zebrafish (*Danio rerio*): futuro do modelo animal em pesquisa biomédica. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE VETERINÁRIA, 2014.
5. DIAS, Cláudio Alberto Gellis de Mattos; et.al. Melatonina e Peixes: Uma Revisão. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. Edição 09. Ano 02, Vol. 04. pp 140-158, Dezembro de 2017. ISSN:2448-0959.
6. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* [Internet]. 2005 [cited 2021 Jun 6];131(3):759–68.
7. Barbalho PG, Lopes-Cendes I, Maurer-Morelli CV. Indomethacin treatment prior to pentylentetrazole-induced seizures downregulates the expression of il1b and cox2 and decreases seizure-like behavior in zebrafish larvae. *BMC Neurosci*. 2016 Mar 9;17:12. doi: 10.1186/s12868-016-0246-y. PMID: 26961169; PMCID: PMC4785663.
8. Westerfield M. O livro do peixe-zebra. Um guia para o uso laboratorial do peixe-zebra (*Danio rerio*). 4ª ed. Eugene: Univ. da Oregon Press; 2000
9. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Estágios de desenvolvimento embrionário do peixe-zebra. *Dev Dyn*. 1995; 203 (3): 253–310.
10. Lunkes LC. Efeitos da melatonina sobre os parâmetros bioquímicos e comportamentais em zebrafish (*Danio rerio*) submetidos ao estresse agudo e crônico. Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2018.